

# ERİŞKİN SIÇANLARDA FOKAL SEREBRAL İSKEMİK KORTEKSE FÖTAL KORTEKS TRANSPLANTASYONU

## TRANSPLANTATION OF FETAL CORTICAL TISSUE TO FOCAL ISCHEMIC CEREBRAL CORTEX IN ADULT RATS

İmran SAFİ, Muammer DOYGUN, Ender KORFALI, Kaya AKSOY

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji A.B.D.

Türk Nöroşirürji Dergisi 2 : 14-17, 1991

**ÖZET :** Bu çalışmada, orta serebral arter (OSA) oklüzyonu yapılarak iskemi modeli oluşturulan sıçanlarda (n:45) iskemik korteks bölgesine fetal korteks parçaları implante edildi. Greftlerin (n:25) bu bölgedeki yaşamları ve fonksiyonlarını araştırmak amacıyla greftlemeden 10 hafta sonra yapılan incelemede, sham kontrol grubu sıçanların spontan motor aktivitelerinde belirgin azalma saptandı. Ancak greft konulan sıçanlarda, motor aktivitelerinde düzelme görülmedi. Histolojik olarak, infarktlı bölgeye konulan greftlerin tamamının nekroze olduğu ve greftlerin yaşamadığı saptandı.

**Anahtar Kelimeler :** OSA oklüzyonu, İskemi, Greft, Nöral transplantasyon, Reinnervasyon.

**SUMMARY :** In this study, fetal cortical tissues obtained from 15-16 day old fetuses (crown-rump length 12-14 mm) were implanted into the ischemic frontoparietal cortex which was performed with occlusion of middle cerebral artery through sub-temporal approach. Ischemic area were controlled with TTC (2-3-5-tripheniltetrazolium chloride) staining. Two months after transplantation the rats were tested for evaluation of the effects of grafts on the spontaneous motor activity and also for survival of the implants on the ischemic area. Sham group of rats showed significant impairment of motor activity. Experimental group showed similar impairment of spontaneous motor activity and there was no surviving grafts also histological examination revealed total necrosis.

**Key Words :** MCA occlusion, Ischemia, Graft, Reinnervation neural transplantation.

### GİRİŞ

Kortikal greftlerin denendiği ilk çalışmalarda greftler direkt olarak kortekse konulmuş ve greftlerin çoğunlukla yaşamadığı saptanmıştır (5,8,15,17) daha sonra yapılan çalışmalarda greftin yaşaması ve fonksiyon yapabilmesi için optimal vaskülarizasyonun gerekliliği vurgulanmıştır. Kortekse kavite açılarak yapılan geç greftleme sonrası, vasküler yatak oluşturulduğunda greftlerin daha iyi yaşadığı ve fonksiyonel bağlantılar kurabildiği çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir(5,8,9,12,14,15,17,19).

Son zamanlarda deneysel çalışmalarda tıkalı damar hastalıkları sonucu gelişen infarkt bölgesine, fetal doku greftleri konulmuş ve bu greftlerin alıcı beyin dokusu ile yeni bağlantılar kurabildiği ve bu bağlantıların fonksiyon bozukluğunu düzeltebildiği gösterilmiştir (17).

İskemik alana konan greftlerin yaşayıp yaşamadığına karar verebilmek için, öncelikle üniform bir iskemik alan oluşturmak gerekliliği tartışılmaz bir gerçektir. Daha önceki çalışmalarda % 75'e varan greft yaşama oranının (17) kanımızca iskemik modelin iyi seçilmemesinden kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

Bu çalışmada öncelikle standart iskemi modeli oluşturmak ve daha sonra bu bölgeye kortikal fetal

greft koyarak greftin yaşamını ve fonksiyonunu araştırmayı amaçladık.

### MATERYAL METOD

Deneyde Wistar cinsi 10-12 haftalık ve 160-200 g ağırlığında dişi sıçanlar kullanıldı. Greftler 15-16 günlük fetuslardan (Crown-rump uzunluğu 12-14 mm) elde edildi.

Deneyde kullanılan sıçanlar dört gruba ayrıldılar:

**1. İnfarkt grubu:** Proksimal OSA oklüzyonu yapılan ve yaşatılan 45 sıçan bu gruba oluşturdu. Bu gruptan 25 sıçan taransplantasyon için, 10 sıçan Sham kontrol grup için, 10 sıçan da TTC (2-3-5- tripheniltetrazolium Chloride) ile boyanarak uniform infarkt bölgesinin gösterilmesi için kullanıldı.

**2. Transplantasyon grubu:** 1. Gruptan alınan 25 sıçanın fronto-parietal bölgesine fetal greft konuldu.

**3. Sham-kontrol grubu:** Bu grupta 10 sıçana sub-temporal kraniektomi yapılarak duraları açıldı. OSA oklüzyonu yapıldı ve 15-30 gün sonra bu gruba frontoparietal kavite açılarak sham kontrol grubu oluşturuldu.

**4. Normal kontrol grubu:** Hiçbir işlem yapılmayan 10 sıçandan oluşan bu grup spontan motor aktivite ölçümleri için kullanıldı.

OSA oklüzyonu Tamura ve arkadaşlarının tekniği ile yapıldı (25). Ancak girişim esnasında sıçanların uzun süre yaşaması amaçlandığından zigoma ve temporal adale korundu, trakeostomi yapılmadı.

OSA oklüzyonundan 15 gün sonra sağ fronto-parietal bölgeye 2-3mm'lik kraniektomi yapılarak kortikal dokusu aspire edilen sıçanlara, daha önce gebe bırakılan ve gebeliğinin 15.-16. günlerinde bulunan fütuslardan Das ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntem ile greft alınarak konuldu (9).

Tüm gruplar nörolojik defisit yönünden klinik gözleme alındı. İnfarktlı gruptan rastgele seçilmiş 10 sıçan TTC ile boyandı. Global olarak çıkarılan beyinlerde İnfarkt alanı, koronel kesitler alınarak değerlendirildi.

İnfarktlı grup sıçanlar 30. günde, sham kontrol grubu ve greftli grup 2. operasyondan sonraki 5.-10. hafta arasında dekapite edilerek beyinleri alındı ve % 10 formalin içinde 7 gün bekletildi. Parafin koronel kesitler alınarak H&E ile boyandı.

Tüm gruplarda sıçanlar ikişerli gruplar halinde Animex kaydedici cihaza (L.K.B.FARAD HAGERDSEN, SWEDEN) konarak A ve B tipi hareketler yönünden incelendi (A tipi: Büyük ve küçük toplam hareketler, B tipi: Büyük hareketler)

## BULGULAR

OSA oklüzyonu yapılan ve yaşam süresi 15 gün üzerinde olan 45 sıçandan rastgele seçilen 10 sıçan beyni, TTC ile boyanarak hepsinde % 100 frontal ve sensorimotor korteks bazal ganglia ve kaudat nukleus lateralinde infarkt bölgesi gösterildi.

OSA oklüzyonu sonrası 24 saat sonra anesteziden çıkan sıçanlarda nörolojik defisitler Smith'in nörolojik skor tablosuna göre değerlendirildi (24). Grade 3 ve grade 2 durumundaki ağır nörolojik kusuru olan sıçanlar 48 saat sonra grade 1 durumuna eriştiler.

Kontrol grubu olarak kullanılan gruptaki sıçanlara 15-30 gün sonra sağ fronto-parietal bölgelerine kavite açılarak sham kontrol grubu oluşturuldu. 30. günde alınan spontan motor aktiviteleri, normal, infarktlı ve greft grubu ile karşılaştırıldı. Sham kontrol grubundaki sıçanlar 30. uncu günün sonunda dekapite edilerek beyinleri TTC ile boyandı. Sağ hemisferde OSA alanında infarkt ve fronto-parietal kavite dışında bulgu saptanmadı.

Tüm gruplarda A ve B tipi hareketlerin tesbiti için spontan motor aktiviteleri saptandı (Tablo 1-2). Bu değerlere T anlamlılık testi uygulandı. Her iki tip harekette de sham aleyhine anlamlı bir farklılık saptandı. Ancak sham kontrol grupla greft grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmedi.

**Tablo I : A Tipi Spontan Motor Hareketler**

A TİPİ SPONTAN MOTOR AKTİVİTE			
	Ortalama	S. Sapma	S. Hata
Normal Grup (n:10)	12035	3303	1045
Sham Kontrol Gr (n:10)	8753	2555	808
Greft Grubu (n:15)	11873	4023	1272
DEĞERLENDİRME			
	T Değeri	Anlamlılık	
Normal-Sham K.	2.48	p<0.05*	
Normal-Greft	0.09	p<0.05	
Sham K.-Greft	2.07	p<0.05	

**Tablo II : B Tipi Spontan Motor Hareketler**

B TİPİ SPONTAN MOTOR AKTİVİTE			
	Ortalama	S. Sapma	S. Hata
Normal Grup (n:10)	6770	5539	1752
Sham Kontrol Gr (n:10)	2498	1077	341
Greft Grubu (n:15)	3021	1267	401
DEĞERLENDİRME			
	T Değeri	Anlamlılık	
Normal-Sham K.	2.39	p<0.05*	
Normal-Greft	2.08	p<0.05	
Sham K.-Greft	-0.99	p<0.05	

İnfarktlı grubun histopatolojik incelemesinde koronel kesitlerde frontal sensorimotor korteks ve kaudat nukleus lateral segmentini içeren bölgede hücrel infarkt, çevre dokuda demiyelinizasyon ve kapiller proliferasyon görüldü. Greftli grupta nekroze alan içinde nekroze olmuş grefte ait doku görüldü. İnfarkt çevresinde ise yetersiz revaskülarizasyon ve demiyelinizasyon dışında bulgu saptanmadı.

## TARTIŞMA

Literatürde insan modeline benzerlik gösterebilecek çeşitli iskemi modelleri öneren araştırmalara rastlanmaktadır (7). Bu araştırmalarda infarktın uzun süredeki etkileri, ortaya çıkan ensefalomalazi sahasının değerlendirilmesi ve tedavisi hakkında ise az sayıda çalışma mevcuttur (17,23,27,28).

Deneyssel araştırmalarda iskemik alan oluşturabilmek için ekstrakranial arterlerin oklüzyonu, intravasküler embolizasyon ve OSA oklüzyonu gibi çeşitli metodlar denenmiştir. Ekstrakranial arterlerin tam oklüzyonu çeşitli vasküler anomalilerden ve operasyon sırasında görülen hipotansiyon ve hipoksiden dolayı standart olmamaktadır (4,5,12,17). İntravasküler embolizasyon ise aynı şekilde bu türdeki deney hayvanlarının vasküler yapılarındaki çeşitli anomalilerden ve tekniğin zorluğundan dolayı tercih edilmemektedir.

İlk defa Tamura ve arkadaşları, tarafından tarif edilen OSA proksimalinin subtemporal kraniektomi ile oklüzyonunda ise %100 oranında frontal, sensori-motor korteks, bazal ganglia ve kaudat nukleus lateralinde infarkt bölgesi oluşturulmaktadır(25). Bu teknikte kısa süreli olarak sıçanların yaşaması amaçlandığından hipoksi ve hipontasyon kontrolü için trakeotomi ve kateter konularak ventilasyon, ortalama arter basıncının kontrolü için femoral kateterizasyon önerilmektedir. (1,3,4,10,20,21,22,26,27,28).

Çalışmamızda sıçanların uzun süreli yaşaması amaçlandığından, teknik uygulanırken temporal adale, mandibulanın koronoid çıkıntısı ve zygoma arkusu korundu. İşlemi daha az invaziv hale getirmek için trakeostomi ve femoral kateterizasyon yapılmadı.

Postoperatif geç dönemde bulgularda da bahsedildiği gibi %100 uniform fronto-parietal iskemik alan elde edildi.

Sıçan embriolarından elde edilen nöral greftleri erişkin sıçan beyinlerine transplante edildiğinde yaşadığı ve fonksiyon yaptığı, histokimyasal, farmakolojik ve motor aktivite ölçümleriyle gösterilmiştir (2,5,8,12,15,16,18,19,21). Ayrıca immatür transplantların nörojenезisi işaretlenmiş timidin otoradyografisi ile de gösterilmiştir (7,8,24).

Vaskülaritenin greftin serebral dokuda yaşamasını sağlayan çok önemli bir faktör olduğu Stenevi ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüş ve bu nedenle gecikmiş greftleme tarif edilmiştir (2,5,6,11,16,18). Gecikmiş greftleme tekniğindeki amaç kavite açıldıktan sonra 5-10 gün beklemek ve bu süre içinde greftin kavitede yaşaması için gerekli vasküler yatağın oluşmasını sağlamaktır.

Nöral greftlerde kan akımının önemi Jones ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, greft kan akımının çevre dokudan daha az olduğu saptanarak gösterilmiştir (13). Greftin yaşaması için çevre dokunun vaskülaritesi bu kadar önem taşımakta iken, Mampolan ve arkadaşları temporal intraluminal oklüzyon yapılan sıçanlarda oluşturulan iskemik bölgeye fütal korteks transplantasyonu yapıldığını ve greftlerin yaşama oranlarının %75 olduğunu bildirmektedirler(17).

İskemik bölgede bu oranda yüksek bir greft yaşama oranı bize, iskemik alanın üniform olmamasından kaynaklandığını düşündürdü ve üniform iskemik modeli oluşturmak amacı ile Tamura ve arkadaşlarının tekniğini kullandık(25).

Greftlemeden 5-10 hafta sonra sıçanların spontan motor aktivitelerinde sham grup sıçanlardan normal

gruptakilere göre belirgin düşme saptandı. Greft konan grupta ise greftleme sonrası spontan motor aktivite değerlerinde anlamlı artış bulunmadı.

Bütün gruplarda yapılan nöropatolojik çalışmalarda OSA oklüzyonundan sonra fronto-parietal kortekste infarkt sahasında piknosite ile birlikte, inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptandı. Greft konan grupta aynı şekilde greft dokusunda ve çevre dokularda benzer infarkt bulguları gözlemlendi.

Sonuç olarak daha önceki yayınlarda infarktlı sahada fütal doku transplantasyonlarında yaşama oranı %75 olarak bildirilmesine rağmen, bu çalışmada kullanılan iskemik modelinin kanımsızca üniform ve yeterli iskemik alan oluşturulmamasından kaynaklandığı, çalışmamızda olduğu gibi üniform iskemik oluşturulduğunda ise, greft dokusunun %100 nekroze olacağı ve greftin bu bölgede yaşayarak fonksiyon yapamayacağı görüşündeyiz.

**Yazışma Adresi :** Yrd. Doç. Dr. Muammer Doygun,  
U.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji A.B.D.  
BURSA

#### KAYNAKLAR

1. Albanese V, Tommasino C, Spadaro A. et al: A transbasis sphenoidal approach for selective occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Experimentia* 36:1302-1304. 1980
2. Backlund EO, Granberg PO, Knutsson E. et al: Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. *J Neurosurg* 62:169-173. 1985
3. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM. et al: Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304-1308. 1986
4. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M. et al: Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17:472-476. 1986
5. Björklund A, Stenevi U: Intracerebral neural implants: Replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Ann Dev Neurosci* 7:279-308. 1984
6. Castro AJ, Zimmer J, Sunde NA. et al: Transplantation of fetal cortex to the brain of newborn rats: A retrograde fluorescent analysis of callosal and thalamic projections from transplant to host. *Neurosci Lett* 60:283-288. 1985
7. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL. et al: A model of focal ischemic stroke in the rat: Reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17:738-743. 1986
8. Das GD, Hallas BH: Transplantation of brain tissue in the brain of adult rats. *Experimentia* 34:1304-1306. 1978
9. Das GD, Hallas BH, Das KG: Transplantation of neural tissues in the brains of laboratory mammals: Technical details and comments. *Experimentia* 35:143-286. 1979
10. Duverger D, Mc Kenzie ET: The quantification of cerebral influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:449-461. 1988
11. Jaeger CB, Lund RD: Transplantation of embryonic occipital cortex to the tectal region of newborn rats: light microscopic study of organization and connectivity of the transplants. *J Comp Neurol* 194:571-597. 1980
12. Jaeger CB, Lund RD: Transplantation of embryonic occipital cortex to the brain of newborn rats *Exp Brain Res* 40:265-272. 1980
13. Jones SC, Korfali E, Knowles WD. et al: Blood flow in neural grafts. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:726. 1989
14. Korfali E: Sıçanlarda denerve edilmiş korpus striatumun fütal dopaminerjik nöron greftleri ile reinnervasyonu. Doçentlik Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi. 1981

15. Lund RD, Hauschka SD: Transplanted neural tissue develops connections with host rat brain. *Science* 193:582-584, 1976
16. Madrazo I, Durucker-Colin R, Diaz V, et al: Open microsurgical autografts of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *New Eng J Med* 316:831-834, 1987
17. Mampalan TJ, Gonzales MF, Weinstein P, et al: Neuronal changes in fetal cortex transplanted to ischemic adult rat cortex. *J Neurosurg.* 69:904-912, 1988
18. Moore RY: Parkinson's disease - A new therapy? - *New Eng J Med* 316:872-873, 1987
19. Mufson EJ, Labbe R, Stain DG: Morphologic features of embryonic neocortex grafts in adult rats following frontal cortical ablation. *Brain Res* 401:162-167, 1987
20. Nakai H, Yamamoto YL, Diksic M, et al: Time-dependent changes of lumpet and rate constants in the deoxyglucose method in experimental cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:640-648, 1987
21. Palaoglu S, Benli K, Pamir MN, et al: Examination of autologous and embryonic cortical brain tissue transplantation to adult brain cortex in rats. *Surg Neurol* 29:183-190, 1988
22. Scremin OU, Scremin AME: Physostigmine induced reversal of ischemia following acute middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 17:1004-1008, 1986
23. Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, et al: Recirculation model following MCA occlusion in rats. *J. Neurosurg* 63:272-273, 1985
24. Smith AL, Hoff JT, Nielson SL, et al: Barbiturate protection in acute focal cerebral ischemia. *Stroke*: 5:1-7, 1974
25. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al: Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:53-60, 1981
26. Tyson GW, Teasdale GM, Graham DI, et al: Focal cerebral ischemia in the rat: Topography of hemodynamic and histopathological changes. *Ann Neurol* 15:559-567, 1984
27. Yamamoto M, Tamura A, Kirino T, et al: Effects of a new thyrotropin-releasing hormone devivative on behavioral changes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 20:362-366, 1989
28. Yamamoto M, Tamura A, Tirino T, et al: Effects of a mew thyrotropin-releasing hormone analogue administered in rats 1 week after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 20:1089-1091, 1989